

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-159922

(43) 公開日 平成9年(1997)6月20日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 2 B 21/06			G 0 2 B 21/06	
G 0 1 N 37/00			G 0 1 N 37/00	B F

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-324897

(22) 出願日 平成7年(1995)12月13日

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 徳永 万喜洋

大阪府吹田市千里山月が丘11-3

(72) 発明者 齋藤 究

大阪府堺市中百舌鳥町6-998-3-5-1106

(72) 発明者 柳田 敏雄

兵庫県川西市けやき坂2-45-8

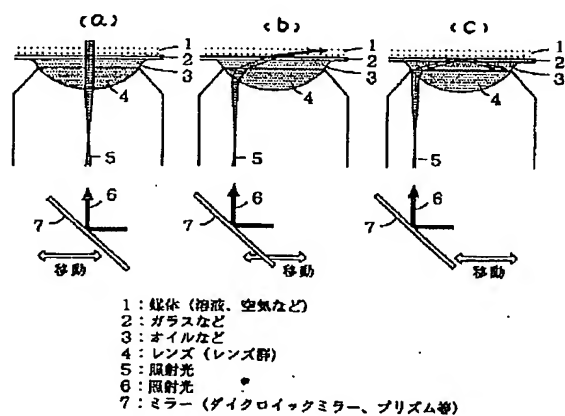
(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 光照射切り替え方法

(57) 【要約】

【課題】 光照射の光路を、簡単な光学系と、簡単な操作で切り替え可能とし、蛍光顕微鏡等において、落射照明と全反射照明との併用や切り替えを容易とする。

【解決手段】 照射光を反射するミラーを移動させて、レンズ光学系での光照射光路を切り替える。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 レンズ光学系での光照射の光路切り替えの方法であって、照射光を反射するミラーを移動させることによって切り替えることを特徴とする光照射切り替え方法。

【請求項2】 複数のミラーにより光照射光路を形成する光学系において、少くとも一つのミラーを移動させる請求項1の方法。

【請求項3】 光学系が顕微鏡であり、落射照明と全反射照明との併用と切り替えを行う請求項1または2の方法。

【請求項4】 顕微鏡が蛍光顕微鏡、原子間力顕微鏡、トンネル顕微鏡、またはフォントンネル顕微鏡である請求項3の方法。

【請求項5】 光学系が微小針によるナノメートル計測系である請求項2の方法。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれかの方法の実施のための機構であって、ミラーの直線移動機構を備えていることを特徴とする光照射切り替え機構。

【請求項7】 中央部の結像用レンズの周縁部に全反射照明用レンズが配置されている請求項1ないし5のいずれかの方法のための対物レンズ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、光照射切り替え方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、顕微鏡等のレンズ光学系において、照射光の光路を簡便に切り替え、ミクロの次元と領域での観察を容易とすることのできる新しい光照射切り替え方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術とその課題】従来より、顕微鏡、特に蛍光顕微鏡の分野においては、落射照明と全反射照明との、併用やその切り替えを簡単な方法で可能とすることが望まれていた。それと言うのも、原子間力顕微鏡(AFM)、トンネル顕微鏡(STM)、フォトンSTM(NSOM)、微小ガラス針によるナノメートル計測法等の、ミクロの次元や領域を対象とする場合の照明では、全体的な像観察とともに、局所的でかつ1分子・原子レベルの観察が必要とされているからである。

【0003】たとえば蛍光顕微鏡の照明として、現在一般的に使われている落射照明方法についてみると、図1に示したように、光源(水銀ランプまたはレーザー)からの光を投光管を経て、ダイクロイックミラーで照射光を反射させ(蛍光は透過させる)、対物レンズの中央に入射させて試料面を照射している。また、ガラス表面近傍のみを局所的に照明する方法として全反射照明が知られているが、これは、ごく限られた利用のみでほとんど使われていないが、全反射したガラス表面から試料溶液側にしみ出す光であるエバネッセント光(深さ100nm

m程度)を使って照明するもので、図2に示したようにプリズムを使う方法と、図3のように対物レンズを使う方法とがある(参考文献:Daniel Axelrod, Meth. Cell. Biol. 30, 245-270(1989))。

【0004】図3に示した対物レンズを使う方法では、開口数(NA)が下記の式を満たす対物レンズにより全反射照明が可能とされている。

$$NA > n$$

NA: 対物レンズの開口数

n: 試料溶液の屈折率

ただし、この方法では、対物レンズ内で光が散乱しないように入射することが重要である。

【0005】そして、これらの方法については、最近、落射蛍光法の改良と、プリズムを使った全反射照明により、蛍光色素1分子の観察が可能となってもいる(参考文献:T. Funatsu et al., Nature, 374, 555-559(1995))。また、全反射照明法では、バックグラウンド・ノイズ(散乱光など)が極めて低く、たとえば、蛍光色素1分子のような観察にも大変有効であることがわかってきている(照明が局所的であるという制約がある)。

【0006】しかしながら、従来、一般的には、対物レンズを使った全反射照明は投光管を経由することによる光学設計の点や、対物レンズ内での散乱が予想され、蛍光色素1分子の観察に利用できることは考えられていなかったため、さらには、対物レンズによる全反射照明そのものの有用性が認識されていなかったために、特に専用の対物レンズは存在せず、通常の油浸対物レンズで高い開口数を有するものが使われているのが現状である。このため、全反射照明の有用性が高まるにつれ、対物レンズによる全反射照明について適切なレンズや手法等の光学系を用意することで、その有用性をさらに生かすことが考慮されねばならない状況にある。

【0007】このような状況において、全反射照明法の特徴と利点を生かして落射照明と組み合わせることが試みられているが、そのための適切な光学系については依然として多くの改善すべき点が残されている。特に指摘されるべきことは、落射照明とプリズム使用の全反射照明とを合わせ、その併用と切り替えにより全体像観察と局所的な観察を行う従来の試みでは、両者の照射光は顕微鏡入射前でいったん2つの光に分かれ、別々の光路を経由して照明され、両者の切り替えには、シャッター・ミラー等が使われていることである。このような光学系の構成では、落射照明には投光管、全反射照明にはプリズムと、それぞれ専用の光学系が必要であり、さらに、2光路分岐および切り替え用の部品も必要とされており、全体的に、かなり複雑で、しかも面倒な操作が必要とされる態様となっているのである。

【0008】そこで、この発明は、以上の通りの従来の技術における問題点を解消し、簡単な光学系と、簡便な

操作で、蛍光顕微鏡等のレンズ光学系に有用な、落射照明と全反射照明方法との、併用と切り替えをも容易とする、新しい照射光光路の切り替え方法を提供することを目的としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】この発明は上記の課題を解決するものとして、レンズ光学系での光照射の光路切り替えの方法であって、照射光を反射するミラーを移動させることによって切り替えることを特徴とする光照射切り替え方法を提供する。また、この発明は、複数のミラーにより光照射光路を形成する光学系において、少くとも一つのミラーを移動させる方法をも提供する。

【0010】そして、この発明は、光学系が顕微鏡であり、落射照明と全反射照明との併用と切り替えを行う方法や、顕微鏡が蛍光顕微鏡、原子間力顕微鏡、トンネル顕微鏡、またはフォントンネル顕微鏡である方法、光学系が微小針によるナノメートル計測系である方法等をその態様として提供する。さらにまた、この発明は、上記のいずれかの方法の実施のための機構であって、ミラーの直線移動機構を備えていることを特徴とする光照射切り替え機構も提供する。

【0011】この発明は、以上のとおりの簡単な光学系と操作で、試料側（レンズの上側）に、何ら光学系を必要とせずに、探針等を持ち込む作業空間を確保し、落射照明と全反射照明との併用・切り替えを可能としているのである。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、詳しくこの発明の方法、さらにはそのための機構について説明する。まず、この発明の基本的原理については、たとえば添付の図4により説明することができる。すなわち、この図4に例示したように、この発明の方法では、ミラー（ダイクロイックミラー、プリズム等）（7）の移動のみで照射の仕方を切り替え可能としている。

【0013】図4（a）は落射照明の状態を示しており、ミラー（7）を移動させることで、図4（c）の全反射照明の状態に切り替えることができる。ミラー

（7）の移動によって、反射された照射光（6）（5）は、落射照明から全反射照明へと変化する。図4（a）の落射照明、そして図4（c）の全反射照明は、蛍光顕微鏡において特に有用であり（実施例1、2、3参照）、また、図4（c）の全反射照明や図4（b）の様な適当な角度の照明は、原子間力顕微鏡のような探針を使った系において、探針の先端の照明に有用でもある（実施例4、5参照）。

【0014】なお、図4（a）（b）（c）は、ミラー（7）を直接移動させているが、このようにミラー（7）を移動させなくとも、ミラー（7）により照明光（6）が反射される位置を、光源からの照射光の照射位置の移動によって変えてもよいことは言うまでもない。

実際には、このような反射位置の変更による方法が、実施例にも示したように光学系の構成としては現実的でもある。

【0015】図4に示した全反射照明のためのレンズとしては、開口数（NA）が下記の式を満たしさえすればよい。

$NA > n$

NA：レンズの開口数

n：レンズと反対側の媒体（1）の屈折率

ここでの全反射照明を蛍光顕微鏡に用いれば、高いS/N（像が明るく背景が暗い）の像が得られ、蛍光色素1分子の観察が可能となる（実施例1、3参照）。

【0016】また、ミラー（7）の切り替えと同時に、集光用レンズ等の光学部品を切り替えることも考えられるが、基本的にミラー（7）の操作によって照明系を変化させることになる。集光用レンズ等の配置に制約は無いが、操作するミラー（7）よりも光源側に集光用レンズを配置することにより光学系が簡単となる場合が多い（実施例参照）。

【0017】また、図5に例示したように、新しい対物レンズを用いることにより、さらに高いS/Nの全反射照明を行うことが可能となる（実施例2参照）。この例では、照明用部分と結像用部分とを区切ることを本質的な特徴としている。照明の散乱光や迷光が結像側に漏れないため、背景光が減少し高いS/Nを実現する。

【0018】もちろん、照明用のレンズやミラーの組合わせは、レンズ、ミラー、プリズム等により種々の光学設計としてよく、照明用のレンズの焦点距離も目的により変えることができる（ $f = \infty$ 、すなわちレンズでない場合も含めて）。

【0019】

【実施例】以下、実施例によりさらに詳しくこの発明の実施の形態について説明する。

（実施例1）図6は、この発明の照射切り替え方法を蛍光顕微鏡に適用した例を示したものである。

【0020】照射光源（レーザー）からの光を集光用レンズを介してミラーで反射させ、さらに反射された照射光をダイクロイックミラーにより反射させ、これにより全反射を行い、試料からの蛍光をダイクロイックミラーを介して取出し、カメラにより撮像する。そして、この例のシステムでは、集光用レンズからの光を反射する光源側ミラーを移動させることで、ダイクロイックミラーでの照射光の反射位置を変化させ、通常の落射照明と全反射照明との併用、切り替えを行っている。

【0021】このようにすることで、通常の落射照明と全反射照明との切り替えを、ミラーの移動のみで簡単に行うことができる。このシステムによる全反射照明の使用により、溶液中の蛍光色素分子1個が通常のビデオ像として観察できることになる。

（実施例2）図7は、図5に例示した特有のレンズを蛍

光顕微鏡で使用した例を示したものである。

【0022】この例では、結像用レンズと全反射照明用レンズとにより構成された対物レンズを用いて実施例1と同じ蛍光顕微鏡システムを形成している。対物レンズ内での照射光の散乱等がないため、実施例1よりも背景光が少なく、より良い像を与える事ができる。

(実施例3) 図8は、この発明の照明切り替え方法を原子間力顕微鏡に使用した例を示している。

【0023】原子間力顕微鏡(AFM)に、蛍光顕微鏡を組み込み、実施例1および2と同様に、ミラーの移動によりダイクロイックミラーでの照射光の反射位置を移動させ、落射照明と全反射照明との併用や切り換えを行うようにしている。これにより、落射照明・全反射照明の切り替えを可能とし、計測試料の蛍光観察を可能としている。

【0024】AFMの他に、トンネル顕微鏡(STM)、フォトンSTM(NSOM)、ガラス微小針を使ったナノメートル計測装置などの、原子分子レベルの計測技術に、同様にこの発明の方法を適用することが可能である。より具体的には、この例では、ガラス表面上の計測試料の蛍光観察としては、まず落射照明により一般的な蛍光像を得る。次に、全反射照明により局所的な(ガラス表面から約100nmの深さまで)像を、蛍光色素分子1個が見えるような高いS/N(Signal/Noise; 像が明るく背景が暗い)で得る。

(実施例4) 図9は、探針先端の観察を可能とするシステムを例示したものである。

【0025】探針を使った計測システム(AFM、STM、NSOM、ナノメートル計測技術など)に、この発明の方法を適用し、探針先端のみの観察を可能としている。全反射照明によるエバネッセント光は、ガラス表面から深さ約100nm程度までしかしみ出さないので、探針先端のみの蛍光像観察が高いS/Nで可能となる。一方、落射照明では、探針全体が照明されるため先端のみの観察が難しい。

【0026】なお、図9には、蛍光像観察のシステムを記載してあるが、次の実施例5のように散乱光の観察システムを用いることにより、全反射照明による探針先端からの散乱光の観察が可能となる。そして、上記のいずれの場合にも、蛍光強度あるいは散乱強度から、探針のガラス表面からの距離を知ることできる。

(実施例5) 図10は、斜光照明により探針先端領域の

観察を可能とするシステムを例示したものである。

【0027】探針を使った計測システム(AFM、STM、NSOM、ナノメートル計測技術など)に、この発明の方法を適用し、探針先端領域の観察を可能とした系である。全反射となる手前の位置にミラーをおいた場合、照明光は試料溶液中では図の様に斜め方向となり、先端領域の照射が可能となる。

【0028】照明角度を適宜選択することにより、照射領域を変えることが可能となる。なお、図10には、散乱光観察のシステムを記載してあるが、前記実施例4のように蛍光観察のシステムとすることも可能である。そして、散乱強度あるいは蛍光強度から、探針のガラス表面からの位置を知ることできる。

【0029】

【発明の効果】この発明により、以上詳しく説明したとおり、簡単な光学系と、簡単な操作により、顕微鏡技術、特に蛍光顕微鏡技術に有効な、落射照明と全反射照明方法との、併用と切り替えが可能となる。さらに、原子間力顕微鏡(AFM)、トンネル顕微鏡(STM)、フォトンSTM(NSOM)等マイクロ世界の研究分野での新しい展開が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】一般的な落射照明方法を例示した説明図である。

【図2】一般的な全反射照明としてのプリズムを使う方法を例示した説明図である。

【図3】一般的な全反射照明としての対物レンズを使う方法を例示した説明図である。

【図4】この発明の光照射の切り替え方法を例示した説明図である。

【図5】この発明における新しい対物レンズを例示した説明図である。

【図6】実施例としての蛍光顕微鏡での照射切り替え方法を示した概略図である。

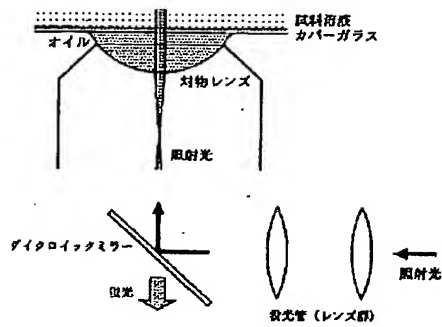
【図7】実施例としての蛍光顕微鏡での全反射照明用対物レンズの使用例を示した概略図である。

【図8】実施例としての原子間力顕微鏡での照射切り替え方法を示した概略図である。

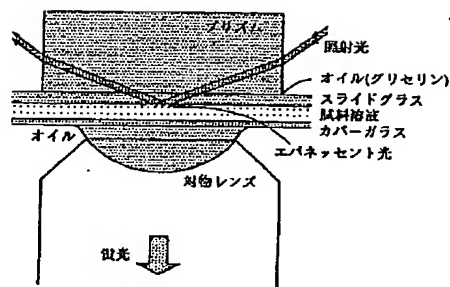
【図9】実施例としての探針計測システムとこの発明の蛍光顕微鏡システムを組み合わせた概略図である。

【図10】実施例としての探針計測システムとこの発明の照明システムを組み合わせた概略図である。

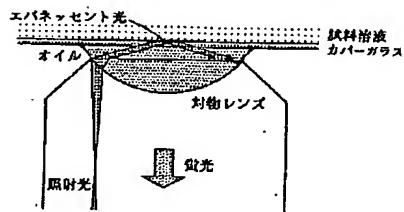
【図1】



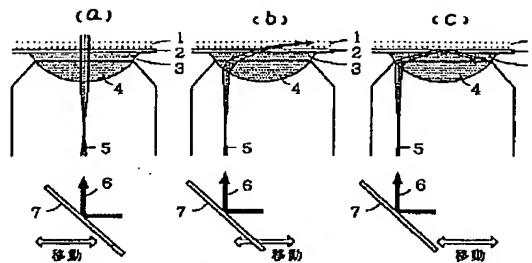
【図2】



【図3】

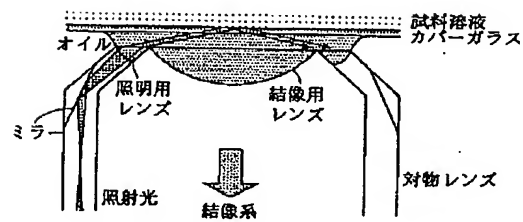


【図4】

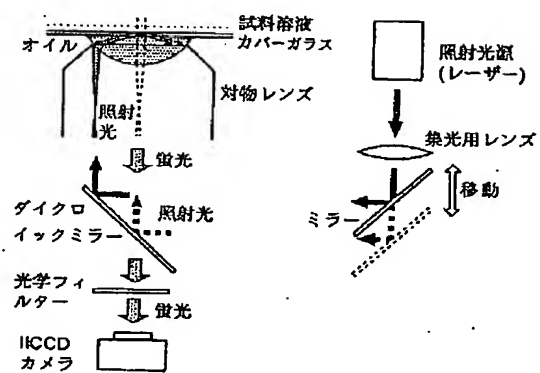


- 1: 媒体 (溶液、空気など)  
 2: ガラスなど  
 3: オイルなど  
 4: レンズ (レンズ群)  
 5: 照射光  
 6: 反射光  
 7: ミラー (ダイクロイックミラー、プリズム等)

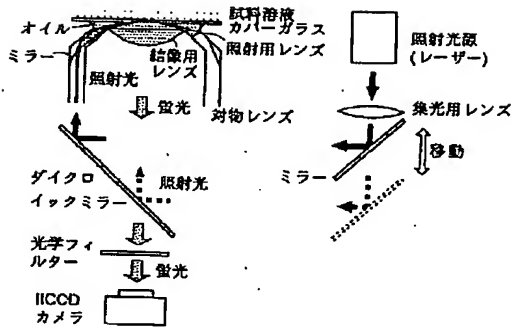
【図5】



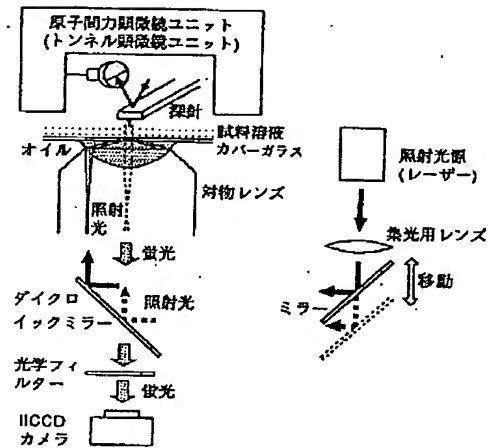
【図6】



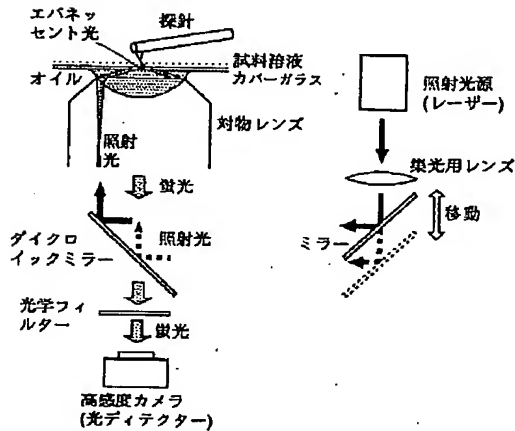
【図7】



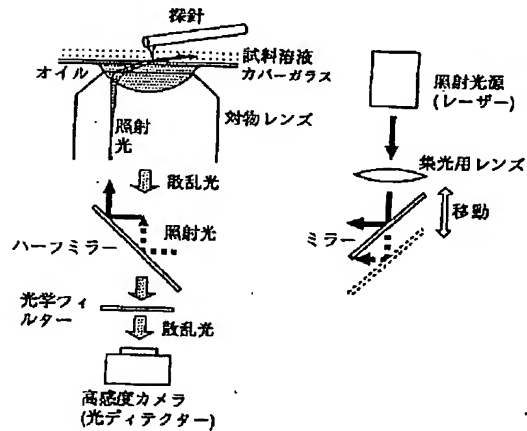
【図8】



【図9】



【図10】



## 【手続補正書】

【提出日】平成8年1月23日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正内容】

【0025】探針を使った計測システム（AFM、ST

M、NSOM、ナノメートル計測技術など）に、この発明の方法を適用し、探針先端のみの観察を可能としている。全反射照明によるエバネッセント光は、ガラス表面から深さ約100nm程度までしかしみ出さないで、探針先端のみの蛍光像観察が高いS/Nで可能となる。一方、落射照明では、探針全体が照明されるため先端のみの観察が難しい。